

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 778 527

(21) N° d'enregistrement national :

98 06475

(51) Int Cl⁶ : A 01 H 1/00, C 12 N 15/63

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 18.05.98.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : RHONE POULENC AGRO Société
anonyme — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 19.11.99 Bulletin 99/46.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) :

(54) NOUVELLE METHODE DE PRODUCTION DE TOCOPHEROLS DANS LES PLANTES ET PLANTES
OBTENUES.

(57) La présente invention concerne un procédé de production de tocophérols dans des plantes génétiquement modifiées, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la surexpression d'une hydroxyphénol pyruvate dioxygénase (HPPD) dans les chloroplastes des cellules végétales des dites plantes génétiquement modifiées.

FR 2 778 527 - A1



Nouvelle méthode de production de tocophérols dans les plantes, et plantes obtenues

La présente invention concerne une nouvelle méthode de production de tocophérols dans les plantes, et les plantes obtenues à forte teneur en tocophérols.

5 La vitamine E et les tocophérols sont des composants essentiels dans les organismes vivants, en particulier végétaux ou animaux, notamment par leurs propriétés antioxydantes. Ils sont d'ailleurs couramment employés en alimentation humaine ou animale, de même qu'en cosmétique.

10 Il est aujourd'hui connu que le niveau d'expression de tocophérols, en particulier de vitamine E dans les plantes, peut être modulé et contrôle en contrôlant l'expression d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse des tocophérols, la para hydroxyphénol pyruvate dioxygénase, ci-après HPPD (WO 97/27285).

15 Cette HPPD se trouve dans de nombreux organismes vivants, unicellulaires, en particulier bactériens, ou pluricellulaires, en particulier dans les plantes où elle est exprimée dans le cytoplasme cellulaire pour produire de l'homogentisate à partir de l'acide para hydroxyphénol pyruvique (WO 96/38567). Il a d'ailleurs été constaté que les enzymes de plantes étaient des enzymes cytoplasmiques, ne comprenant pas de séquence de type « peptide de transit » susceptibles de conduire à l'expression d'une protéine mature dans les chloroplastes (Garcia I. & al. (1997) *Biochem. J.* 325 :761-769).

20 L'HPPD est par ailleurs la cible de nombreux herbicides, et il a été constaté que sa surexpression dans des plantes génétiquement modifiées par l'intégration dans le génome desdites plantes de gènes codant pour une HPPD sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés pour l'expression de ladite HPPD, permettait d'obtenir une tolérance améliorée aux herbicides inhibiteurs de cette enzyme (WO 96/38567).

25 Dans les cellules végétales transformées avec les gènes ci-dessus, il va y avoir une activité HPPD supérieure à celle normalement trouvée dans une cellule végétale du même type non transformée. Cette activité supplémentaire va entraîner la production d'une plus grande quantité d'homogentisate dans la cellule. Cet homogentisate a deux devenir possibles dans une cellule végétale. Il peut soit être dégradé dans le cytoplasme, soit être transporté dans 30 le chloroplaste pour être utilisé comme précurseur de molécules indispensables au bon fonctionnement de l'appareil chloroplastique. Toutefois, si cette surproduction d'homogentisate a lieu dans le cytoplasme une grande quantité de cet homogentisate

supplémentaire sera dégradé via l'homogentisate dioxygénase, limitant fortement la possibilité d'augmenter de manière substantielle la quantité de tocophérols et de vitamine E produits dans la plante transformée.

5 Bien que l'enzyme naturelle soit une enzyme cytoplasmique, on a maintenant trouvé que le fait d'exprimer une HPPD dans les chloroplastes des plantes permettaient d'augmenter substantiellement la teneur en tocophérols et en vitamine E desdites plantes transformées, tant vis à vis des plantes non transformées (HPPD native uniquement) que vis à vis des plantes transformées assurant une surexpression d'HPPD dans le cytoplasme uniquement, décrites dans l'état de la technique (WO 97/27285).

10 La présente invention concerne donc nouveau procédé de production de tocophérols dans des plantes génétiquement modifiées, lequel procédé consiste à cultiver une plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la surexpression d'une HPPD dans les chloroplastes des cellules végétales des dites plantes génétiquement modifiées.

15 L'HPPD sureprimée dans les chloroplastes selon l'invention peut être de différentes origines, notamment d'origine bactérienne ou de plantes, en particulier de *Pseudomonas sp*, d'*Arabidopsis*, de carotte, de blé, etc. Plusieurs séquences protéiques d'HPPD et les séquences nucléotidiques codant pour lesdites séquences protéiques, les moyens de les isoler sont décrites dans la littérature, notamment dans la demande de brevet WO 96/38567, dont le contenu est incorporé ici par référence. Il peut également s'agir d'HPPD ayant subi au moins 20 une mutation dans leur région C-terminale, telles que décrites dans la demande de brevet FR 97 14264, dont le contenu est incorporé ici par référence.

25 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'HPPD peut être surexprimée dans les chloroplastes par la surexpression dans le cytoplasme d'une protéine de fusion comprenant un peptide de transit lié à l'HPPD à son extrémité N-terminale (peptide de transit/HPPD).

Les peptides de transit utiles selon l'invention et leurs séquences codantes comprennent tous les peptides de transit de précurseurs cytoplasmiques de protéines ou de polypeptides à localisation plastidiale de plantes, préférentiellement chloroplastiques. Il s'agit notamment du peptide de transit de la petite sous unité de la ribulose-1,5-bisphosphate 30 carboxylase/oxigénase ou de la protéine de liaison chlorophyllienne a/b décrits avec leurs séquences codantes dans le brevet US 5,728,925, dont le contenu est incorporé ici par référence. Il s'agit également du peptide de transit de l'EPSPS de plante décrit dans le brevet

US 4,940,835, dont le contenu est incorporé ici par référence.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le peptide de transit est un peptide de transit multiple constitué par un premier peptide de transit un d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, une partie de la 5 partie mature N terminale d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, puis un deuxième peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale. De manière préférentielle, le premier et deuxième peptide de transit sont différents. Par différent, on entend selon l'invention des peptides de transit provenant de précurseurs cytoplasmiques de protéines ou polypeptides à localisation 10 plastidiale différents, ou des peptides de transit provenant de mêmes précurseurs de protéines ou polypeptides, mais de plantes différentes. Les peptides de transit multiples selon l'invention sont notamment décrits dans le brevet US 5,633,448 dont le contenu est incorporé ici par référence. De manière préférentielle, le peptide de transit multiple est le peptide de transit optimisé décrit avec sa séquence codante dans le brevet US 5,633,448, comprenant le 15 peptide de transit de la petite sous unité RuBisCO de tournesol, une séquence de 22 acides aminés de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs et le peptide de transit de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs. La séquence d'ADN codant pour le peptide de transit optimisé associée à la séquence codant pour une HPPD de *Pseudomonas* est représentée par l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO 1), et notamment décrite dans la demande de brevet 20 WO 96/38567. Les gènes chimères comprenant une telle séquence, les vecteurs de transformation des plantes, les cellules végétales transformées les contenant et les plantes régénérées à partir de ces cellules transformées sont décrits dans la demande de brevet WO 96/38567. Il est entendu que la transformation et la régénération des plantes selon un mode particulier préférentiel dépendra de la plante sélectionnée dans laquelle on souhaite 25 surexprimmer l'HPPD dans les chloroplastes. Il est entendu que les techniques de transformation et de régénération des plantes est maintenant bien connue de l'homme du métier. Ces transformations sont effectuées en particulier par l'introduction de particules accélérées enrobées d'ADN dans les cellules végétales, par l'introduction de l'ADN dans les cellules végétales au moyen d'une agitation du milieu contenant les deux en présence 30 d'aiguilles, par les techniques d'électroporation ou encore au moyen de cellules d'*Agrobactérium* appropriées. Ces techniques sont notamment décrites dans les brevets et demandes de brevet suivants : US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US

5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US
5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US
5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US
5,405,765, EP 270 615, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO
5 91/02071 et WO 95/06128.

Les plantes génétiquement modifiées appropriées pour effectuer une surexpression de l'HPPD dans les chloroplastes sont en particulier décrites dans la demande de brevet WO 96/38567, dont le contenu est incorporé ici par référence.

10 Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'HPPD peut être surexprimée dans les chloroplastes en introduisant dans le génome chloroplastique desdites plantes un gène codant pour une HPPD sous le contrôle d'éléments de régulation fonctionnels dans les chloroplastes. Les techniques d'insertion de gènes dans les chloroplastes, comme les éléments de régulations appropriés à l'expression desdits gènes dans les chloroplastes sont bien connus de l'homme du métier, et notamment décrites dans les brevets et demandes de
15 brevet suivants : US 5,693,507, US 5,451,513 et WO 97/32977.

20 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, les plantes appropriées pour le procédé selon l'invention sont choisies parmi les plantes monocotylédones ou dicotylédones, en particulier potagères ou de grande culture, notamment choisies parmi les tomates, les céréales, les plantes oléagineuses, et plus particulièrement parmi le maïs, le colza, le soja, le tournesol.

25 Certaines plantes peuvent être modifiées de manière à avoir une teneur en huiles spécifiques différentes de celle trouvées naturellement dans les plantes, de manière à obtenir des plantes à plus haute valeur ajoutée et à modifier leurs qualités nutritionnelles. Il s'agit notamment de produire des maïs à plus forte teneur en huiles, ou encore des tournesols, des sojas ou des colzas enrichis en acides gras essentiels à santé humaine ou animale. Ces plantes à teneur en huiles modifiées peuvent être obtenues par des méthodes conventionnelles de croisement et de sélection, ou encore par introduction dans le génome desdites plantes d'un ou plusieurs gènes hétérologues dont l'expression permet de modifier le contenu en huiles tant qualitatif que quantitatif. De telles plantes transformées sont notamment décrites dans les
30 brevets suivants : US 5,378,758, US 5,434,283, US 5,476,524, US 5,545,821, US 5,602,311, US 5,625,130, US 5,638,637, US 5,668,299 ou US 5,710,366. Les gènes codants pour des protéines susceptibles de modifier le contenu en huiles des plantes, et les plantes transformées

les contenant sont notamment décrits dans les brevets et demandes de brevet suivants : WO 98/06862, WO 98/05758, WO 97/48793, WO 97/16559, JP 9 065 882, WO 97/12047, WO 97/07222, WO 96/31609, WO 96/24674, WO 96/02652, JP 6 090 766, WO 93/11245, WO 91/18985, WO 91/13972, US 5,706,603, US 5,704,160, US 5,689,050, US 5,663,068, US 5,639,790, US 5,614,393, US 5,589,619, US 5,530,186, US 5,512,482, US 5,500,361, US 5,498,544 ou US 5,254,801.

Pour des plantes modifiées de manière à produire des teneurs en huiles à haute valeur ajoutée (tant par la qualité que par la quantité des huiles produites) il est nécessaire de protéger efficacement les huiles produites, en particulier contre leur oxydation qui les rendraient inexploitables et/ou leur ferait perdre toute valeur. Il a été ainsi constaté pour certains maïs modifiés de manière à produire de grandes quantités d'huiles, tels que ceux décrits dans le brevet US 5,704,160, un phénomène d'oxydation accéléré desdites huiles et de rancissement, qui rendaient les grains de ces maïs inexploitables, en particulier pour l'alimentation animale. En augmentant la production de tocophérols et de vitamine E dans de telles plantes modifiées, il est possible de protéger lesdites huiles produites contre les phénomènes d'oxydation.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la plante dans laquelle IHPPD est surexprimée dans les chloroplastes est une plante à teneur en huiles modifiée telle que décrite ci-dessus.

Le gène codant pour une protéine de fusion peptide de transit/HPPD, ou pour l'expression directe d'HPPD dans les chloroplastes peut être introduit dans les dites plantes soit directement en employant les techniques usuelles du génie génétique, notamment décrites ci-dessus, soit par croisement et sélection avec une plante mère comprenant ledit gène.

Dans le cas de plantes modifiées par les techniques de génie génétique de manière à exprimer une ou plusieurs protéines modifiant son contenu en huiles, tant qualitatif que quantitatif, le ou les gènes codant pour lesdites protéines modifiant le contenu en huiles peuvent être introduits dans le génome de ladite plante simultanément avec le gène codant pour une protéine de fusion peptide de transit/HPPD. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les gènes seront introduits simultanément et associés dans un même vecteur, en particulier un même plasmide, de manière que les gènes soient toujours associés dans le génome de la plante transformée. Dans ce cas, non seulement le gène codant pour la protéine de fusion peptide de transit/HPPD permettra de préserver de l'oxydation les huiles de la plante

obtenue, et donc sa valeur, mais également du fait de ses propriétés de tolérance à certains herbicides décrites dans la demande de brevet WO 96/38567, il facilitera la sélection des plantes à haute valeur ajoutée dans les programmes de sélection des semenciers.

Après culture des dites plantes génétiquement modifiées de manière à surexprimer HPPD dans les chloroplastes, les tocophérols et la vitamine E peuvent être extraits et purifiés, totalement ou en partie, selon les méthodes usuelles, tant des feuilles que des graines des plantes cultivées. Dans le cas des plantes modifiées de manière à modifier leur teneur en huiles, les tocophérols et la vitamine E peuvent être extraits simultanément avec les huiles des dites plantes cultivées, assurant simultanément la préservation des dites huiles contre les phénomènes d'oxydation et l'enrichissement des dites huiles avec des molécules à hautes valeur ajoutée essentielles à la santé animale et humaine, et à leur alimentation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les plantes cultivées ou leurs graines peuvent être employées telles quelles, sans extraction préalable de la vitamine E et des tocophérols comme élément alimentaire, seul ou en mélange destiné à l'alimentation humaine ou animale.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1 : Teneur en vitamine E de tabacs modifiés

Les tabacs modifiés CY et CO décrits dans les exemples 2 à 5 de la demande de brevet WO 96/38567 ont été cultivés. La teneur en vitamine E dans les feuilles des tabacs cultivés est mesurée après extraction de la vitamine E. Les analyses montrent une teneur en vitamine supérieure pour le tabac CO avec localisation de l'HPPD dans les chloroplastes.

L'analyse a été faite de la manière suivante : extraction qualitative non altérante menée à l'aide d'un système de solvant type hexane :isopropanol 3 :2 (v/v), mais d'autres mélange sont utilisables. Puis dosage des tocophérols par CLHP selon divers protocoles comme entre autre celui référencé IUPAC 2.432.

Exemple 2 : Teneur en vitamine E d'un soja modifié

Des tissus soja, variété Jack et variété Chapman ont été transformés comme suit : Les tissus de soja sont transformés par la technique de bombardement de particules (Finer et Mc Mullen, 1991, *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27P: 175-182.).

La régénération du soja est obtenue selon le protocole décrit par Finer et Mc Mullen,

1991. Des suspensions embryogènes sont initiées à partir de cotylédons zygotiques immatures; ces suspensions sont rendues compétentes à la transformation par repiquages successifs sur un milieu contenant du 2,4 D. Les tissus de soja sont alors transformés par la technique de bombardement de particules. La sélection des tissus se fait sur un milieu 5 contenant l'hygromycine comme agent de sélection à la dose de 30 ppm. La régénération des cals embryogènes en plantes fertiles est obtenue par une conversion des cals en embryons par retrait du 2,4 D. Ces embryons sont ensuite enracinés et mis à germer sur un milieu approprié. Les jeunes plantes sont transférées en serre.

10 Nous avons obtenu selon ce procédé des sojas Jack et Chapman. Ils comprennent un gène codant pour une protéine de fusion OTP/HPPD, décrite par l'identificateur de séquence n° 1, sous le contrôle d'éléments de régulation comprenant un promoteur Double histone et de l'activateur de transcription TEV et un terminateur Nos (construit identique à celle introduite dans les tabacs modifiés CO de l'exemple 1 et représenté schématiquement dans la figure suivante).

15

Représentation schématique du gène de l'OTP/HPPD



- Promoteur double histone
- Activateur de transcription (TEV)
- Peptide de transit optimisé
- Région codante de l'HPPD
- Terminateur nos

20 Ces sojas modifiés, avec une forte activité HPPD dans les plastes, ont montré une tolérance à de très fortes teneurs en isoxaflutole (herbicide inhibiteur d'HPPD). La teneur en vitamine E dans les feuilles et les graines de ces sojas transformés est très nettement supérieure à la teneur en vitamine E des sojas non transformés correspondants.

LISTE DE SEQUENCES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1449 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: OTP
- (B) EMPLACEMENT: 1..372

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: HPPD
- (B) EMPLACEMENT: 373..1446

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT TCG ATC TCC TCC TCA GTC GCG ACC GTT AGC CGG ACC GCC CCT Met Ala Ser Ile Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro	48
1 5 10 15	
GCT CAG GCC AAC ATG GTG GCT CCG TTC ACC GGC CTT AAG TCC AAC GCC Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala	96
20 25 30	
GCC TTC CCC ACC ACC AAG AAG GCT AAC GAC TTC TCC ACC CTT CCC AGC Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser	144
35 40 45	
AAC GGT GGA AGA GTT CAA TAT ATG CAG GTG TGG CCG GCC TAC GGC AAC Asn Gly Gly Arg Val Gln Tyr Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn	192
50 55 60	
AAG AAG TTC GAG ACG CTG TCG TAC CTG CCG CCG CTG TCA ATG GCG CCC Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro	240
65 70 75 80	
ACC GTG ATG ATG GCC TCG TCG GCC ACC GCC GTC GCT CCG TTC CAG GGG Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly	288
85 90 95	
CTC AAG TCC ACC GCC AGC CTC CCC GTC GCC CGC CGC TCC TCC AGA AGC Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser	336
100 105 110	
CTC GGC AAC GTC AGC AAC GGC GGA AGG ATC CGG TGC ATG GCA GAT CTA Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Met Ala Asp Leu	384
115 120 1	

TAC GAA AAC CCA ATG GGC CTG ATG GGC TTT GAA TTC ATC GAA TTC GCG 432
 Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe Ile Glu Phe Ala
 5 10 15 20

TCG CCG ACG CCG GGT ACC CTG GAG CCG ATC TTC GAG ATC ATG GGC TTC 480
 Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ile Met Gly Phe
 25 30 35

ACC AAA GTC GCG ACC CAC CGT TCC AAG AAC GTG CAC CTG TAC CGC CAG 528
 Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His Leu Tyr Arg Gln
 40 45 50

CGC GAG ATC AAC CTG ATC CTC AAC AAC GAG CCC AAC AGC ATC GCC TCC 576
 Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn Ser Ile Ala Ser
 55 60 / 65

TAC TTT GCG GCC GAA CAC GGC CCG TCG GTG TGC GGC ATG GCG TTC CGC 624
 Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly Met Ala Phe Arg
 70 75 80

GTG AAG GAC TCG CAA AAG GCC TAC AAC CGC GCC CTG GAA CTC GGC GCC 672
 Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu Glu Leu Gly Ala
 85 90 95 100

CAG CCG ATC CAT ATT GAC ACC GGG CCG ATG GAA TTG AAC CTG CCG GCG 720
 Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu Asn Leu Pro Ala
 105 110 115

ATC AAG GGC ATC GGC GGC GCG CCG TTG TAC CTG ATC GAC CGT TTC GGC 768
 Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile Asp Arg Phe Gly
 120 125 130

GAA GGC AGC TCG ATC TAC GAC ATC GAC TTC GTG TAC CTC GAA GGT GTG 816
 Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr Leu Glu Gly Val
 135 140 145

GAG CGC AAT CCG GTC GGT GCA GGT CTC AAA GTC ATC GAC CAC CTG ACC 864
 Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile Asp His Leu Thr
 150 155 160

CAC AAC GTC TAT CGC GGC CGC ATG GTC TAC TGG GCC AAC TTC TAC GAG 912
 His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala Asn Phe Tyr Glu
 165 170 175 180

AAA TTG TTC AAC TTC CGT GAA GCG CGT TAC TTC GAT ATC AAG GGC GAG 960
 Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp Ile Lys Gly Glu
 185 190 195

TAC ACC GGC CTG ACT TCC AAG GCC ATG AGT GCG CCG GAC GGC ATG ATC 1008
 Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro Asp Gly Met Ile
 200 205 210

CGC ATC CCG CTG AAC GAA GAG TCG TCC AAG GGC GCG GGG CAG ATC GAA 1056
 Arg Ile Pro Leu Asn Glu Ser Ser Lys Gly Ala Gly Gln Ile Glu
 215 220 225

GAG	TTC	CTG	ATG	CAG	TTC	AAC	GGC	GAA	GGC	ATC	CAG	CAC	GTG	GCG	TTC	1104
Glu	Phe	Leu	Met	Gln	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Val	Ala	Phe	
230															240	
CTC	ACC	GAC	GAC	CTG	GTC	AAG	ACC	TGG	GAC	GCG	TTG	AAG	AAA	ATC	GGC	1152
Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Trp	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	
245															260	
ATG	CGC	TTC	ATG	ACC	GGC	CCG	CCA	GAC	ACT	TAT	TAC	GAA	ATG	CTC	GAA	1200
Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Met	Leu	Glu	
265															275	
GGC	CGC	CTG	CCT	GAC	CAC	GGC	GAG	CCG	GTG	GAT	CAA	CTG	CAG	GCA	CGC	1248
Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	
280															290	
GGT	ATC	CTG	CTG	GAC	GGA	TCT	TCC	GTG	GAA	GGC	GAC	AAA	CGC	CTG	CTG	1296
Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	Arg	Leu	Leu	
295															305	
CTG	CAG	ATC	TTC	TCG	GAA	ACC	CTG	ATG	GGC	CCG	GTG	TTC	TTC	GAA	TTC	1344
Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val	Phe	Phe	Glu	Phe	
310															320	
ATC	CAG	CGC	AAG	GGC	GAC	GAT	GGG	TTT	GGC	GAG	GGC	AAC	TTC	AAG	GCG	1392
Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Gly	Asn	Phe	Lys	Ala	
325															340	
CTG	TTC	GAG	TCC	ATC	GAA	CGT	GAC	CAG	GTG	CGT	CGT	GGT	GTA	TTG	ACC	1440
Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	Gly	Val	Leu	Thr	
345															355	
GCC	GAT	TAA														1449
Ala	Asp															

REVENDICATIONS

1. Procédé de production de tocophérols dans des plantes génétiquement modifiées, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la surexpression d'une hydroxyphénol pyruvate dioxygénase (HPPD) dans les chloroplastes des cellules végétales desdites plantes génétiquement modifiées.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'HPPD est surexprimée dans les chloroplastes par la production dans le cytoplasme d'une protéine de fusion comprenant un peptide de transit lié à l'HPPD à son extrémité N-terminale (peptide de transit/HPPD).

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le peptide de transit comprend un peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale de plantes, préférentiellement chloroplastiques.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le peptide de transit comprend le peptide de transit de la petite sous unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou de la protéine de liaison chlorophyllienne a/b ou le peptide de transit de l'EPSPS de plante.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le peptide de transit est un peptide de transit multiple constitué par un premier peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, une partie de la partie mature N terminale d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, puis un deuxième peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le peptide de transit multiple est le peptide de transit optimisé comprenant le peptide de transit de la petite sous-unité de la RuBisCO de tournesol, une séquence de 22 acides aminés de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs et le peptide de transit de la petite sous-unité de la RuBisCO de maïs.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine de fusion peptide de transit/HPPD a la séquence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la plante est

choisie parmi les tomates, les céréales, les plantes oléagineuses, et plus particulièrement parmi le maïs, le colza, le soja, le tournesol.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la plante est une plante à teneur en huile modifiée.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les tocophérols sont extraits et purifiés, totalement ou en partie.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les plantes cultivées ou leurs graines sont employées telles quelles, sans extraction préalable de la vitamine E et des tocophérols comme éléments alimentaires, seuls ou en mélanges destinés à l'alimentation humaine ou animale.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

Documents considérés comme pertinents			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL ⁶)
Y,D	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 Juillet 1997 * abrégé ; revendications 1-17 ; figures 1,2 * * page 4, alinéa 2 * * page 7, alinéa 2 – page 15, alinéa 2 * * page 24, alinéa 1 – page 28, alinéa 2 *	1-11	C 12 N
Y,D	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR) ; ROLLAND ANNE (FR) ;) 5 décembre 1996 * abrégé ; revendications 9-22 ; exemples 1-3,6 * * page 1, ligne 1 – page 4, ligne 7 *	1-11	
E	WO 9904021 A (BASF AG) 28 janvier 1999 * abrégé ; revendications 1-24 ; figure 4 * * page 5, ligne 4 – ligne 30 * * page 7, ligne 28 – page 10, ligne 14 * * page 13, ligne 13 – page 16, ligne 32 *	1-4,8-11	
Date : 19 Février 1999		Examinateur : Oderwald, H	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	